

**Az intestinalis ischemiás prekondicionálás mechanizmusának
vizsgálata - a neuronális nitrogénmonoxid szintetáz
lehetséges szerepe**

Dr. Varga Sándor

Ph.D. Tézis

Multidiszciplináris Doktori Iskola

Témavezetők:

Dr. habil. Szabó Andrea Ph.D.

Dr. habil. Kaszaki József Ph.D.

**Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Sebészeti Műtéttani Intézet**

Szeged

2019

1. BEVEZETÉS

A vékonybél transzplantáció (SBTX) egy lehetséges életmentő megoldás lehet a intestinalis funkciózavarban szenvedő páciensek számára. A legújabb immunszuppresszív kezelési lehetőségek jelentős mértékben javítják ugyan az SBTX klinikai kimenetelét, a kedvezőtlen graft túlélés elsősorban azonban nem az immunológiai reakciókra, hanem a hypoxiás és/vagy az ischemia/reperfúziós (IR) károsodásra vezethető vissza. Mind a meleg, mind a hideg ischemiás (pl.: SBTX) periódust súlyos biokémiai és mikrokeringési következmények jellemzik, amelyek befolyásolják a rendkívül sérülékeny mucosa barrier integritását. Ezek a változások a bél permeabilitás növekedésétől kezdve, a bél eredetű endotoxin és intraluminális baktériumok transzlokációján át szepszishez, többszervi elégtelenséghez vezethetnek, akár halált is okozva. Az SBTX hosszú távú következménye továbbá a denerváció következtében kialakuló vékonybél motilitás zavar is. A vékonybél IR okozta károsodás számos súlyos következménye jelentős mértékben csökkenthető ischemiás preconditionálás (IPC) által, amely eljárás során rövid, átmeneti ischemiás és reperfúziós periódusokat alkalmaznak a végső ischemiás inzultus előtt.

A mikrokeringési változások (a mikrovaszkuláris vérellátás zavara és a gyulladáshoz vezető reakciók) kritikus módon befolyásolják a nyálkahártya barrier integritását IR során, ezért a célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az IPC hatását a fenti folyamatokra SBTX során is. Az első tanulmányban a lokális, intestinalis IPC következményeit vizsgáltuk meg részletesen nagyállat modellben, amelyben a tápcsatorna beidegződése sokkal jobban hasonlít a humán enterális beidegzésre, mint kisebb laboratóriumi állatfajok esetében. Kimutatták, hogy az IPC mechanizmusában a nitrogénmonoxid (NO) fontos mediátor, és a szintéziséért felelős izoenzimek közül a neuronális NO szintetáz (nNOS) a domináns NOS izoforma a gastrointestinalis traktusban. A fentiekre alapozva második tanulmányunkban igazoltuk az nNOS jelentőségét az intestinalis IPC védőmechanizmusában mesenterialis IR során, szelektív nNOS inhibitor 7-nitroindazol (7-NI) alkalmazásával. Az IPC pozitív hatásai közül kimutattuk az NO fokozott termelését, az intramucosalis pH (pHi) rendeződését, a polimorfonukleáris (PMN) leukocita akkumuláció és a hízósejt degranuláció csökkenését, valamint a morfológiai károsodás mérséklését.

2. A KUTATÁS FŐ CÉLKITŰZÉSEI

Elsődleges célunk az volt, hogy összehasonlítsuk az IPC hatásait a hideg és meleg IR következtében létrejövő változásokra a reperfúzió korai szakaszában altatott kutyákon. Vizsgáltuk (1) a lokális intestinalis mikrokeringési, gyulladáshoz és mikrovaszkuláris perfúziós reakciókat, (2) a denervációval összefüggő lehetséges mechanizmusokat, (3) a hízósejtek szerepét és (4) a morfológiai károsodásokat.

Kutatásaink további célja az volt, hogy megvizsgáljuk az nNOS lehetséges szerepét a lokális intestinalis IPC által indukált védőmechanizmusban altatott kutyákon vékonybél IR modellben. E célból, az nNOS specifikus szelektív gátlószerével, 7-NI-vel végeztünk előkezelést az IPC előtt. Vizsgáltuk (1) a makro és mikrokeringési változásokat, (2) a leukocyta akkumulációt, (3) a hízósejt aktivációt, (4) a vékonybél motilitást, (5) a lokális NO produkciót, valamint (6) a strukturális károsodást.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti protokollok

Vizsgálataink két állatkísérletes tanulmányra épültek, a kísérleteket mindkét esetben nagyállat modellen végeztük, nő- és hímivarú kültenyésztett keverék kutyákon, melyek átlagsúlya: 12,2-17,3 kg között mozgott. Mindkét tanulmányban a vékonybél IPC makro- és mikrokeringési, morfológiai, valamint biokémiai változásait vizsgáltuk, az 1. tanulmányban vékonybél autotranszplantációt (hideg ischemiát) követően, míg a 2. tanulmányban vékonybél IR (meleg ischemia) során (1. táblázat).

3.1.1. Az 1. tanulmány kísérleti protokollja

Az első és a második csoport állatain ortotopikus vékonybél autotranszplantációt végeztünk, amely során az intestinalis graftot 60 perc hideg ischemiának tettük ki, amelyet 240 perc reperfüzió követett (SBTX csoport; n=5). A másik kísérleti csoportban a hideg ischemia előtt 60 perccel, 3 ciklusban, 5 perc ischemia/ 10 perc reperfüzió IPC protokollt alkalmaztunk (IPC+SBTX csoport; n=5). A harmadik csoport állatain álműtétet végeztünk (n=5). A reperfüzió során óránként vizsgáltuk fluoreszcens intravitális videomikroszkópiával (IVM) a mesenterium venuláiban a leukocyta-endothelsejt interakciókat. A hideg ischemia előtt és a reperfüziót követően óránként ortogonális polarizációs spektrális képalkotás (OPS) módszerével vizsgáltuk a bélbolyhok mikrokeringési változásait [funkcionális kapilláris denzitás (FCD); vörösvértest áramlási sebesség (RBCV)], valamint a morfológiai eltéréseket (epithelium vastagság, epithelsejt károsodás). A kísérletek elején és végén vett szövetmintákból meghatároztuk a hízósejt degranuláció mértékét.

3.1.2. A 2. tanulmány kísérleti protokollja

Az állatok első csoportjában az arteria mesenterica superior (SMA) 60 perces okklúzióját (meleg ischemiát) követő 120 perces reperfüzió következményeit vizsgáltuk (IR csoport; n=7). A másik két csoportban az IR-t megelőzően 3 ciklusban, 5 perc ischemia/ 5 perc reperfüzió IPC protokollt alkalmaztunk (IPC+IR csoport; n=6). A harmadik csoportban az állatok az IPC előtt 7-NI (5 mg/kg) kezelésben részesültek (IPC+IR+7NI csoport; n=6). Az IR és IPC+IR csoportokban a kutyákat a 7-NI oldószerével (DMSO és fiziológias sóoldat 75% -os keveréke)

kezeltük elő ugyanabban az időpontban. A kísérletek során vett vérmintákból és szövetmintákból később meghatároztuk a plazma nitrit/nitrát (NO_x) szintjét, a NOS és a myeloperoxidáz (MPO) enzimaktivitást, valamint a hízósejt degranuláció és a bélnyálkahártya károsodás mértékét.

1. táblázat Az 1. és 2. tanulmány során alkalmazott beavatkozások és a vizsgált paraméterek listája

	1. tanulmány	2. tanulmány
Vékonybél transzplantáció	+	
Ischemia időtartama	60'	60'
Ischemiás prekondicionálás	3x5'/10'	3x5'/5'
Reperfúzió időtartama	4 h	2 h
Perctérfogat mérés	+	
Arteria mesenterica superior véráramlás mérés	+	+
PMN leukocyta-endothelsejt interakció meghatározás (IVM)	+	
Vörösvértest áramlás meghatározás (OPS)	+	
Intramucosalis pH meghatározás		+
Vékonybél motiliás meghatározás		+
Plazma nitrit/nitrát szint mérés		+
Myeloperoxidáz enzimaktivitás mérése		+
Ileumban a nitrogénmonoxid szintetáz aktivitás mérés		+
Morfológiai változások meghatározása (villus csúcs; OPS)	+	
Morfológiai változások meghatározása (szövetten: Chiu-skála, villus magasság)		+
Hízósejt degranuláció meghatározása (szövetten)	+	+

3.2. Hemodinamikai paraméterek mérése, vérgáz analízis, pH_i meghatározása (1. és 2. tanulmány)

Az artériás és vénás nyomást mindkét tanulmányban Statham jelátalakító készülékkel, az SMA véráramlását ultrahangos áramlásmérő jelátalakítóval mértük. Az 1. tanulmányban a perctérfogatot termodilúciós módszerrel határoztuk meg. A 2. tanulmányban artériás

vérgázokat és az intramucosalis pCO₂-t (szilasztik ballonkatéter alkalmazásával) mértük, a pH-t az előbbi adatok alapján, a Henderson-Hasselbalch egyenlettel számoltuk ki.

3.3. Mikrokeringési mérések (1. tanulmány)

Intravitális videomikroszkópia (IVM)

Mikroszkóp: Zeiss AxioTech Vario 100HD, 100W HBO higanygőz lámpa, Acroplan 20 × vízimmerziós objektív (Carl Zeiss GmbH, Jena, Németország), Kamera: Teli CS8320Bi (Toshiba Teli Corporation, Osaka, Japán)

Jelöléstechnika: rhodamin 6G-vel jelölt PMN-ek (0,2%, 0,1 ml iv) (Sigma, St. Louis, MO, USA,)

Kiértékelés: off-line IVM szoftver (Pictron Kft., Budapest, Magyarország)

Paraméterek: kitapadó leukocyták („sticking”): kitapadt PMN leukocyták száma/mm² endothelsejt felület. „Rolling” leukocyták: gördülést mutató PMN leukocyták száma/„nonadherent” PMN leukocyták száma.

Ortogonalis polarizációs spektrális képalkotás (OPS), Cytoscan A/R, (Cytometrics, PA, USA)

Kiértékelés: off-line IVM szoftver (Pictron Kft., Budapest, Magyarország)

Paraméterek: FCD (perfundált kapillárisok hossza és a vizsgált terület hányadosa), RBCV, epithelium vastagság

3.4. Vékonybél motilitás mérése (2. tanulmány)

A bélmotilitás regisztrálása a terminalis ileum körkörös izomrétegére varrt nyúlásmérő bélyeg mechanikus deformációjának elektromos jellel történő átalakításával történt. A vékonybél neurogén funkciójának jellemzésére a motilitási indexet határoztuk meg (a motilitás görbe alatti területet az idő függvényében).

3.5. A plazma NO_x szint mérése (2. tanulmány)

A plazma NO_x szint koncentrációját a kísérlet kezdeti (t= -30), az ischemia előtti és a reperfüzió 15., 60. és 120. percében vett vérmintákból határoztuk meg a Griess reakció alapján.

3.6. A NOS enzimaktivitás mérés (2. tanulmány)

A NOS enzimaktivitást vékonybél biopsziákból határoztuk meg a ³[H]-L-arginin - ³[H]-L-citrullin enzimatis konverziója alapján. A Ca²⁺-dependens és Ca²⁺-independens NOS aktivitást a reakcióelegyben a Ca²⁺- kalmodulin jelenléte, vagy hiánya alapján állapítottuk meg.

3.7. Az MPO enzimaktivitás mérése (2. tanulmány)

Az MPO enzimaktivitást Kuebler metodikája alapján a vékonybél mucosájából határoztuk meg.

3.8. A hízósejt degranuláció meghatározása (1. és 2. tanulmány)

A hízósejt degranuláció mértékét (MC%) az intakt (iMC) és a degranulált (dMC) hízósejtek számának arányából határoztuk meg [$MC\% = dMC / (dMC+iMC)$], alcián kék-safranin O szövettani festéssel.

3.9. Morfológiai változások meghatározása (2. tanulmány)

Metodika: hematoxylin-eosin szövettani festés

Paraméterek: vékonybél nyálkahártya károsodás mértéke: villus magasság és a teljes nyálkahártya vastagság százalékos aránya, valamint villus magasság és a crypta magasság százalékos aránya; villus csúcs károsodás: módosított Chiu-skála

3.10. Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai analízisét a SigmaStat statisztikai szoftverrel (SigmaStat 13.0 version for Windows, Jandel Scientific, Erkrath, Németország) végeztük. A kiértékelés során nem-paraméteres tesztek alkalmaztunk. Az adatok eloszlásának (Shapiro–Wilk teszt) megfelelően az alábbi vizsgálatokat végeztük: (1) a csoporton belüli eltéréseket Friedmann próbával és Dunn post hoc teszttel vizsgáltuk, (2) a csoportok közötti eltéréseket Kruskal-Wallis próbával vizsgáltuk, az ezek közötti eltérést Dunn próbával teszteltük.

4. EREDMÉNYEK

1. Tanulmány

4.1. Az IPC által kiváltott makrokeringési reakciók az SBTX-t követően

Az SBTX csoportban szignifikáns perctérfogat csökkenés volt mérhető a reperfúzió alatt valamennyi vizsgálati időpontban a kiindulási értékekhez, valamint az álműtött csoporthoz képest is. Az SBTX előtt alkalmazott IPC hatására szignifikáns javulás volt megfigyelhető a reperfúzió 60. és 240. percében. A kiindulási értékhez képest az SMA véráramlás szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető az SBTX csoportban a reperfúzió egész időtartama alatt. Az IPC az álműtött csoporthoz hasonló, szignifikánsan magasabb SMA véráramlást eredményezett az SBTX-t követő reperfúzió alatt.

4.2. Az IPC által kiváltott mikrokeringési gyulladásoz reakciók az SBTX-t követően

Technikai okok miatt nem lehetett IVM vizsgálatot végezni az SBTX előtt, ezért a kiindulási értékek hiányoznak. Szignifikánsan több leukocytá-endothelsejt interakciót figyeltünk meg az SBTX csoportban, mint az álműtött csoportban: reperfúzió során egy egyenletes, kb. 70%-os elsődleges (rolling) és egy emelkedő számú másodlagos (sticking) leukocytá-endothelsejt interakció fokozódást detektáltunk a mesenterium posztkapilláris venuláiban. Az IPC mind a rolling, mind a sticking leukocyták számát szignifikánsan csökkentette.

4.3. Az IPC által kiváltott mikrokeringési reakciók az SBTX-t követően

Az SBTX-t követő reperfüzió a villusok arterioláiban és venuláiban enyhe RBCV csökkenést okozott a kiindulási érték és az álműtött csoporthoz képest. Ebben a paraméterben az IPC-t követően nem mértünk szignifikáns különbséget az IPC+SBTX és az SBTX csoportok között. A villusok kapilláris perfúzióját az FCD-vel jellemeztük, mely szignifikánsan csökkent a reperfüzió alatt az SBTX csoportban, míg a kontroll érték közelében stabilizálódott az IPC+SBTX csoportban.

4.4. Az IPC által kiváltott enterocyták károsodása az SBTX-t követően

Az epithelium vastagsága (az epithelium sérülés és integritás markere) szignifikánsan csökkent a reperfüzió alatt az SBTX csoportban a kiindulási értékhez, valamint az álműtött csoporthoz képest. Az IPC+SBTX csoportban az epithelium vastagsága ugyanakkor csak a reperfüzió 60. percében csökkent a kiindulási értékhez képest, majd ezt követően nem változott, ami kisebb mértékű strukturális károsodásra utal.

4.5. Az IPC által kiváltott hízósejt degranuláció mértéke az SBTX-t követően

A hízósejt degranuláció kiindulási értékeiben nem volt szignifikáns eltérés a csoportok között. Az SBTX csoportban a hideg ischemia önmagában szignifikáns hízósejt degranuláció növekedést okozott a reperfüzió végén, míg az IPC alkalmazása szignifikánsan csökkentette ezt a változást.

2. Tanulmány

4.6. A 7-NI hatása az IPC által kiváltott makrokeringési reakciókra intestinalis IR-t követően

Az ischémiát megelőzően, sem a 7-NI, sem az IPC hatására nem volt különbség a csoportok között a vékonybél véráramlásában. A reperfüzió korai szakaszában (5. perc) átmeneti szignifikáns véráramlás növekedést (hyperemia) tapasztaltunk mindhárom csoportban, mely fokozatosan visszatért a kiindulási értékre.

4.7. A 7-NI hatása az IPC által kiváltott pHi-re intestinalis IR-t követően

A pHi kezdeti értékeit, sem a 7-NI, sem az IPC nem befolyásolta. A 60 perc ischémia meredek csökkenést ($P < 0.05$) okozott a pHi értékében mindhárom csoportban, amelyet fokozatos emelkedés követett a reperfüzió alatt. A pHi értéke mindkét IPC csoportban gyorsabb emelkedést mutatott a reperfüzió 30-60. percében, mint az IR csoportban. A reperfüzió végén azonban a pHi értéke szignifikánsan magasabb volt az IPC+IR csoportban, mint az IR és az IPC+IR+7-NI csoportban.

4.8. A 7-NI hatása az IPC által kiváltott vékonybél motilitásra intestinalis IR-t követően

A 7-NI vagy az IPC önmagában nem befolyásolta a vékonybél motilitás kiindulási értékét, azonban a 7-NI-vel előkezelt csoportban átmeneti motilitás csökkenést figyeltünk meg az IPC-

t követően, amely az ischemia előtt rendeződött. Az ischemia önmagában nem okozott szignifikáns változást, de a reperfúzió korai szakaszában (30. perc) jelentős motilitás növekedést regisztráltunk az IR csoportban. A reperfúzió kezdetén regisztrálható hipermotilitást az IPC alkalmazása teljesen kivédte mindkét IPC csoportban, amelyekben a reperfúzió 60. percében a kiindulási értéknél alacsonyabb motilitást regisztráltunk. A reperfúzió végén a motilitási index mindhárom csoportban normalizálódott.

4.9. A 7-NI hatása az IPC által kiváltott plazma NO_x szintre intestinalis IR-t követően

A kísérlet ideje alatt az IR csoportban nem észleltünk szignifikáns NO_x plazmaszint változást. Átmeneti szignifikáns emelkedést mértünk az ischemia előtt a vivőanyaggal kezelt IPC csoportban, valamint mindkét IPC csoportban a reperfúzió 15. percében. Az IPC-indukálta kezdeti plazma NO_x emelkedést gátolta a 7-NI előkezelés, azonban jelentős plazma NO_x emelkedést figyeltünk meg az IPC+IR+7-NI csoportban a 120 perces reperfúzió végén.

4.10. A 7-NI hatása az IPC által kiváltott ileum NOS aktivitásra intestinalis IR-t követően

A Ca²⁺-independens és Ca²⁺-dependens NOS aktivitás kiindulási értékeiben nem volt szignifikáns különbség egyik csoportban sem. A Ca²⁺-independens NOS (iNOS) aktivitás értékeiben nem volt szignifikáns eltérés a kísérlet teljes időtartama alatt egyik csoport esetében sem. Az IR csoportban sem mértünk szignifikáns Ca²⁺-dependens NOS aktivitás változást a kísérlet teljes időtartama alatt. Az IPC+IR csoportban szignifikáns Ca²⁺-dependens NOS aktivitás változást mutattunk ki a reperfúzió 15. percében, amit az IPC+IR+7-NI csoportban nem detektáltunk.

4.11. A 7-NI hatása az IPC által kiváltott ileum MPO enzimaktivitásra intestinalis IR-t követően

Az MPO enzimaktivitás kiindulási értékeiben nem volt szignifikáns különbség egyik csoportban sem. Szignifikáns emelkedést mértünk azonban az IR csoportban a reperfúzió 15. és 120. percében, valamint az IPC+IR+7-NI csoportban a reperfúzió 15. percében a kiindulási értékekhez képest. Az IR csoporthoz viszonyítva a reperfúzió mindkét időpontjában szignifikáns MPO enzimaktivitás csökkenést mértünk az IPC+IR csoportban.

4.12. A 7-NI hatása az IPC által kiváltott nyálkahártya károsodásra és hízósejt degranulációra intestinalis IR-t követően

A kísérlet kiindulási időpontjában sem hízósejt degranuláció, sem nyálkahártya károsodás nem volt tapasztalható egyik csoportban sem. A 60 perc SMA okklúzió a reperfúzió 15. percében szignifikáns hízósejt degranulációt, nyálkahártya károsodást (enterocytá integritás elvesztése, subepithelialis változások) és nyálkahártya vastagság redukción okozott az IR és az IPC+IR+7-NI csoportban, amely a kísérlet végére (reperfúzió 120. perc) súlyosbodott. Az IPC+IR

csoportban a többi csoporthoz képest szignifikánsan kisebb mértékű hízósejt degranuláció és szövettani károsodás volt megfigyelhető.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az IPC enyhítő hatásai a hideg és meleg intestinalis ischemia által kiváltott keringési és morfológiai károsodásra

A vizsgálatok klinikai jelentősége

Jelen tanulmányaink az SBTX következményeinek a vizsgálatával és befolyásolásával foglalkoztak, így a sebészi beavatkozások által indukált vékonybél ischemia típusos következményeivel. Első tanulmányunkban elsőként írtuk le az IPC-nek az SBTX-re vonatkozó kedvező mikrokeringési következményeit. A vékonybél mikrokeringését két különböző IVM módszerrel vizsgáltuk az SBTX egy nagyállat (kutya) modelljében. A vékonybél autotranszplantáció során hideg graft perfúzió, graft preparálás és éranasztomozis történt a klinikai állapot modellezésére, valamint hogy a lehetséges immunológiai komplikációkat kizárjuk (azaz a megfigyelt változások csak az IR-re vonatkoznak). Ebben az összefüggésben, az IPC terápiás lehetőségét és az nNOS szerepét vizsgáltuk meg sebészi IR modellben (2. tanulmány).

Az intestinalis IR kétféle megjelenése tanulmányainkban

Az 1. tanulmányban IPC-t indukáltunk egy SBTX modellben, míg a 2. tanulmányban az IPC hatását és mechanizmusát vizsgáltuk egy vékonybél IR modellben. A hideg/SBTX és meleg IR között van néhány alapvető különbség: mint a vékonybél szegment (extrinsic) denervációja, a vékonybél fal, valamint az ér és nyirokérhálózat transzszekciója, a hosszabb műteti időtartam, és egyfajta védelem az SBTX esetében (amely a graft hűtési folyamatnak köszönhető). Habár a vizsgált periódus hossza a reperfúzió alatt némileg eltérő volt a két tanulmányban, az azonos ischemiás időtartam miatt az SBTX-re és az IR-re vonatkozó eredményeket összehasonlíthatónak véljük a továbbiakban bemutatott szempontok alapján.

Makrokeringési különbségek

Az egyik különbség az SBTX és az IR modell között az SMA véráramlás mintázata volt. Egyrészt jellegzetes hyperemiás válaszreakciót detektáltunk az IR csoportban a reperfúzió kezdetén, mely az SBTX csoportban nem volt jelen (ugyanakkor az ischemia időtartama mindkét csoportban azonos volt). Másrészt az SMA véráramlás reperfúzió alatti csökkenése nem volt jelentős az IR csoportban, míg SBTX csoportban a hideg ischemia súlyos véráramlás csökkenést eredményezett. A hyperemiás válaszreakció hiánya és a reperfúzió alatti SMA véráramlás csökkenés is magyarázható a béltranszplantációval járó denervációval, valamint annak a lokális vazoregulációra kifejtett hemodinamikai hatásával. Az SBTX csoportban a

lokális mesenterialis véráramlás és a perctérfogat változás hasonló mértékű csökkenést mutatott a reperfúzió teljes időtartama alatt. Mivel nem volt számottevő változás a szívritmusban, a centralis vénás nyomásban és az artériás középnyomásban (ezek az adatok nem kerültek bemutatásra), az SBTX csoportban észlelt alacsony perctérfogat valószínűleg a csökkent szívizom kontraktilitással magyarázható. Mesenterialis ischemia során az érpálya jelentős része érintett, így az előzetesen ischemiás splanchnikus érterületről (a mikrovaszkulaturából) olyan kardiodepresszív anyagok felszabadulása gyanítható, amelyek távoli hatása károsodott szívfunkciót eredményez (negatív inotróp hatásuk révén). Egy másik magyarázata ennek a jelenségnek a mesenterialis mikrokeringést érintő vazokonstrikció lehet. Érdekes módon ezek a makrohemodinamikai változások (a reperfúzió által okozott SMA véráramlás és szívindex csökkenés az SBTX során) előnyösen befolyásolhatók IPC-vel.

Mikrokeringési különbségek

A mikrokeringés károsodása az IR-nek és az SBTX-nek egyaránt jellegzetes következménye (az intravitális mikroszkópiával végzett vizsgálatok szerint). Eredményeink alapján hosszútávú mikrokeringési károsodás feltételezhető mindkét modellben. Az 1. tanulmányban az FCD szignifikáns csökkenést mutatott, amely az IPC-t követően jelentős mértékben javult az SBTX hideg ischemiás modelljében. A 2. tanulmányban a pHi, amely a mucosa oxigenizáció indirekt mérőszáma (ezáltal a mikrokeringés hatékonyságának a becslésére alkalmas), hasonló csökkenést mutatott. Fontos megjegyezni, hogy az IPC hasonló védelmet nyújtott mindkét tanulmányban, függetlenül az ischemia hideg vagy meleg jellegétől, vagy a denervációtól.

Az IR és az SBTX egyaránt a PMN leukocyták által közvetített reakciók markáns fokozódását eredményezték, amely ellen az IPC mindkét modellben hasonló mértékű védelmet nyújtott (1. tanulmány: PMN leukocyta-endothelsejt interakció, 2. tanulmány: MPO enzimaktivitás). Kimutatták, hogy a csökkent PMN leukocyta infiltráció javította a meleg és a hideg ischemia kimenetelét szelektin knockout egerekben. Meleg IR modellünkben a reperfúzió 15. percében emelkedett MPO enzimaktivitást mértünk, de ugyanezt a korai változást figyelték meg a hideg ischemiát követő 6-24. óra után patkányokban is. Ennek ellenére úgy tűnik, hogy a hideg ischemia időtartamának növekedése fokozza az adhézis molekula dependens PMN leukocyta-endothelsejt interakció mértékét. Kimutatták, hogy az IPC a PMN leukocyta szöveti infiltráció hasonló mértékű prevencióját eredményezte SBTX-t követően is. Mások ugyanakkor megállapították, hogy a hideg ischemia nagyobb mértékben befolyásolja az endothelsejteket, mint a meleg ischemia. Ebből a különbségből eredhet a meleg és a hideg ischemiát követő gyulladáshoz vezető válaszreakció eltérő mértéke (makrofágok, neutrophilok, pro-inflammatorikus citokin-dependens mechanizmusok).

Denervációval összefüggő lehetséges folyamatok

Az SBTX során bekövetkező denerváció egy fontos problémát vethet fel: a vékonybél az extrinsic (szimpatikus, paraszimpatikus) beidegzésének elvesztése (intrinsic ideg pályái érintetlenek maradnak) hozzájárul a kialakuló vékonybél dysmotilitáshoz. Mások SBTX-t követően átmeneti intersticiális Cajal-sejt károsodást és megváltozott morfológiájú myenterikus és submucosus ganglionokat találtak. A spontán kontraktilitási funkció körülbelül egy hónapon belül regenerálódott, azonban a lassú hullámok frekvenciájának regenerálódásához sokkal több idő (kb. 18 hónap) volt szükséges. A vékonybél dysmotilitása következtében a béltartalom hosszú távú pangása hozzájárul a baktériumok felszaporodásához. Más vizsgálatokban az extrinsic denerváció motilitási index csökkenést okozott a proximalis colon szakaszon, az exogén NO adása pedig dózisfüggő módon csökkentette a vékonybél simaizom szegmensek spontán és a bazális kontraktilitás aktivitását. Jelen tanulmányunkban az SBTX esetében ugyan nem vizsgáltuk a vékonybél motilitását, de az ileum átmeneti postischemiás motilitás fokozódásán kívül pedig nem találtunk más eltérést a korai reperfüziós időszakban az IR-t követően.

A hízósejt aktivációval kapcsolatos változások

Mindkét tanulmányunkban hasonló mértékű hízósejt degranulációt tudtunk igazolni. A hízósejt degranuláció a vékonybél IR károsodás bizonyított velejárója patkányban, továbbá szerepe van a permeabilitás változásokban kutyában és patkányban is. A hízósejtek facilitálják a mesenterialis afferens jelátvitelt akut vékonybél ischemia során. Más tanulmányokban a hízósejt stabilizátorok (Na-kromoglykolát, ketotifén) használatával csökkent a vékonybél IR károsodás mértéke (csökkent Chiu-skála szerinti érték), javult patkányokban a bőr lebeny túlélése az MPO enzimaktivitás csökkentésével, valamint pozitívan befolyásolta a PMN leukocytá-endothelsejt interakciót macska és patkány bélben. A hízósejt degranuláció szabadgyök képződéstől függő folyamat, mivel a szuperoxid dizmutáz és kataláz csökkentette a hízósejt degranulációt vékonybélben. A hízósejt stabilizálás növelte a patkányokban a túlélést vékonybél IR-t követően. Érdekes módon az IPC pozitív hatása patkány vékonybélben és szívbén a hízósejt eredetű mediátor felszabadulásnak köszönhető.

A hízósejtek szerepe a hideg IR-rel kapcsolatban már felmerült más szervek esetében is. A hízósejtek különösen a vese allograft akut rejeckciója és máj ortotopikus transzplantációja során tanulmányozták. A hízósejtek a pro-és antiinflammatorikus mediátorainak szekréciója révén befolyásolják a tüdő transzplantáció lefolyását és kimenetelét is. A hízósejtek dentritikus sejtekre való aktivációs hatását a transzplantációs biológiai kutatásokban vizsgálták. A mi tanulmányainkban hasonló mértékű hízósejt degranuláció jelentkezett az IR-t és az SBTX-t

követő válaszreakcióként, melyeket az IPC hasonló fokban csökkentett. Ezen eredmények alapján nem zárhatjuk ki a hízósejttel összefüggő folyamatokat az IPC mechanizmusában.

Morfológiai károsodások

Mindkét tanulmányunkban a mucosalis károsodás hasonló súlyosságú volt, amely ellen az IPC hasonló mértékű védelmet nyújtott. A pontos mechanizmus feltárása (necrosis vagy apoptosis) azonban nem tartozott a jelen tanulmányok célkitűzései közé. Mások azonban kimutatták, hogy mind a pHi változások, mind a PMN leukocytá transzmigráció kiterjedése jól korrelál a vékonybél szövettani károsodás súlyosságával és igazolták, hogy a hidegen tárolás önmagában apoptosist indukál különböző sejttípusokban (pl.: endothelsejt, hepatocyták, vese tubularis sejtei) a hideg indukálta vas ion akkumuláció révén (amely triggere a mitochondrialis apoptotikus reakcióknak).

Az első tanulmány következtetései

Az IVM és hagyományos szövettani módszerek segítségével kimutattuk, hogy a meleg IR és a hideg SBTX utáni reperfúzió hasonló mértékű mikrokeringés romlással, feltűnően korai és hasonló arányú PMN leukocytá akkumulációval, hízósejt degranulációval, valamint mucosalis károsodással jár. Az adatainkat összegezve kijelenthetjük, hogy ezeket a változásokat az IPC mindkét tanulmányban hatásosan javítja. A hemodinamikai eredmények értékelése alapján, habár különbséget mutathatunk ki a meleg és a hideg IR között (pl. a postischemiás véráramlásban), az IPC hasonló mértékben befolyásolta azokat.

5.2. Az nNOS szerepe az intestinalis IPC által kiváltott védő hatás vonatkozásában vékonybél meleg ischémiát követően kutyákban

Második tanulmányunkban elsőként mutattuk ki az nNOS szerepét az intestinalis IPC-indukálta védelemben, továbbá megerősítettük a vékonybél IPC protektív hatásának korábban bizonyított eredményeit. E védőhatás megszűnését a szelektív nNOS antagonistá, 7-NI alkalmazásával bizonyítottuk a pHi, a vékonybél motilitás, a PMN leukocytá akkumuláció, a hízósejt degranuláció és a morfológiai károsodás eredményeinek vonatkozásában.

A mucosa károsodás időbeni lefolyása a reperfúzió alatt

A vékonybél különböző strukturális elemeinek sérülése egy meghatározott szekvencia szerint következik be a reperfúzió során. Az enterocyták integritása és a mucosa maradéka viszonylag korán, már a reperfúzió korai fázisában sérül, majd ezt követi az idegi és izom struktúrák károsodása. Vizsgálatunkban az intestinalis mucosa barrier IPC által kiváltott védelme (különösen a villus csúcs esetében) már a reperfúzió 15. percében kialakult és fennmaradt a reperfúzió 120. percéig. Patkányon végzett vizsgálatok is igazolták, hogy az IPC a vékonybél mucosa kifejezett védelmét eredményezi (különösen a villus csúcsnál), ami az apoptosis és a

mucosa permeabilitás csökkenésében nyilvánult meg a reperfüzió korai szakaszában (<120 perc), és az IPC által indukált mucosa regeneráció fokozódásában a reperfüzió késői szakaszában. A vékonybél IPC által kiváltott protekció mechanizmusa szorosan összefügg az oxidatív stresszel (MDA, TNF- α , adhéziós molekula felszabadulás, endothelialis aktiváció), de tulajdonítható NO-függő mechanizmusoknak is, ugyanis mások a reperfüzió korai fázisában tranziens NO felszabadulást detektáltak patkány vékonybélben IR-t követően és az a jelenség IPC mellett is megfigyelhető volt.

NOS aktiváció a reperfüzió alatt

Korábban kimutatták, hogy az intestinalis IR nemcsak csökkenti, de triggereli is az nNOS expressziót a reperfüzió kezdetén, így az első 5 percben *in vitro* (tengerimalacon), valamint a reperfüzió 3. órájában *in vivo* (patkányon) is. Az IPC hatását az nNOS expresszióra és funkcióra (ismereteink szerint) elsőként vizsgáltuk. Az nNOS-dependens NO felszabadulást feltételeztünk az IPC-re adott válaszreakcióként, hiszen a szelektív nNOS inhibitor 7-NI alkalmazását követően a vékonybél elfolyó vénás véréből NO metabolit (NO_x) szint csökkenést mértünk. A reperfüzió kezdetén az IPC-indukálta Ca²⁺-dependens NOS aktivitás emelkedést a 7-NI ugyanakkor gátolta. Jelentős NO_x szint emelkedést figyelhettünk meg a reperfüzió késői fázisában, mely feltételezésünk szerint nem-enzimatis eredetű NO produkcióval magyarázható a postischemiás vékonybél-szövetben, a hypoxia miatt károsodott mikrokeringés következményeként. Tisztázatlan maradt azonban, hogy ez a plazma NO_x emelkedés miért nem volt hatással a vékonybél motilitására vagy a mikrokeringésére (lásd később).

Az nNOS szerepe (hasonlóan az NO szerepéhez) meglehetősen ellentmondásosnak tűnik mind a reperfüzió, mind pedig az IPC vonatkozásában. Rivera és munkatársai szerint az nNOS némi szabadgyök képződést indukál, ennek a NOS izoformának túlnyomórészt protektív szerepe van a vékonybél reperfüziós károsodásával szemben (bél simaizom kontraktilitás és PMN leukocita akkumuláció vonatkozásában). Ugyanez a munkacsoport azt találta, hogy a nitrozatív stressz okozta károsodás a reperfüzió korai szakaszában a mucosát, a késői szakaszában az enterális idegrendszert és az izomréteget érinti. Az nNOS gén genetikai ablációja másutt a vékonybél IR károsodását rontotta (gyulladásos infiltráció, motilitás vonatkozásában). Mindaddig az nNOS IPC-ben betöltött szerepét ilyen összefüggésben kevésbé vizsgálták. Tanulmányunk minden esetre az nNOS pozitív szerepét igazolta az IPC által kiváltott postischemiás reakciókban. Az nNOS protektív hatását más szervekben, pl. szívben is igazolták (*in vitro* és *in vivo*), amely az oxidatív/nitrozatív stressz csökkentésén alapult. Ez a kedvező hatás azonban nem volt észlelhető nem-specifikus NOS gátlószer alkalmazása, vagy nNOS knockout egerek esetén.

Vékonybél motilitás változások a reperfúzió alatt

Ismeretes, hogy a bél IR vérellátás-dependens és/vagy nitroztatív stressz neuronális károsodást okozhat a bélben, mely fajspecifikus és általában hosszú ischemiás idő után alakul ki a reperfúzió késői szakaszában. Jelenlegi bélmotilitás vizsgálataink alapján jelentős neurogén diszfunkciót nem észleltünk a vékonybélben, azonban a reperfúzió elején egy átmeneti motilitás-növekedést regisztráltunk. Fontos megjegyeznünk azonban, hogy a 7-NI adását követően közvetlen átmeneti motilitás csökkenést figyeltünk meg az IR-től függetlenül. Ez az eredmény azért meglepő, mert az nNOS neuronok a bélben a gátló motoneuronokban és a leszálló pálya interneuronjaiban találhatóak. Mások kísérleteiben az nNOS által szintetizált NO hatásaként motilitás csökkenést (állandó simaizom hyperpolarizáció okozta spontán motilitás gátlás) regisztráltak juhokban. Másfelől nonspecifikus nNOS gátlás motilitás csökkenést okozott, melyet alátámasztanak a munkacsoportunk korábbi kísérletei is, ahol a 7-NI kezelés a colon motilitás csökkenésével járt szubakut bélelzáródási modellben kutyákban. A reperfúzió 30. percében regisztrált motilitás-növekedést azonban egyik IPC csoportban sem észleltük. Ilyen jellegű módszerekkel mások nem vizsgálták a bélmotilitás változását a korai reperfúziós időszakban, de 60 perc szegmentális ischemia/ 120 perc reperfúziót követően motilitás-csökkenést mutattak ki (az intestinalis tranzit idő mérése alapján).

Az IR-t követő késői motilitás eredmények némileg ellentmondásosak. Az nNOS knockout egereken végzett kísérletekben a bélmotilitás nem csökkent 2 óra ischemiát követően a reperfúzió 3. órájában, csak 48 órát követően. Ugyanakkor csökkent intestinalis tranzit időt detektáltak nNOS gátlószer alkalmazást követően. Az IPC-t követő IR által indukált motilitás-változásoknak eddig csak a hosszú távú hatását vizsgálták. Kimutatták, hogy az IPC helyreállítja patkányokban a 30 perc ischemia/ 6 óra reperfúzió által okozott motilitás-csökkenést. Jelen vizsgálatunkban elsőként regisztráltuk, hogy az IPC kivédi az IR-indukálta átmeneti motilitás-növekedést a reperfúzió korai szakaszában, melyet a 7-NI kezelés nem befolyásolt.

PMN leukocyttal és hízósejtekkel összefüggő változások

Az ischemiát követő mucosa/enterocytá károsodás leginkább az intracelluláris szabadgyök által mediált folyamat következménye, azonban a vékonybél IR jelentős gyulladásos folyamatokat is indukál (PMN leukocytá akkumuláció, hízósejt degranuláció), melyeket az IPC képes meggátolni. Patkányokban kimutatták, hogy a vékonybél IR már korán, a reperfúzió 30-60. percében PMN leukocytá akkumulációt (emelkedett MPO enzimaktivitás) okoz. Kísérleteinkben hasonló korai szimultán emelkedést figyeltünk meg mind a szöveti MPO enzimaktivitásban, mind pedig a hízósejt degranulációban az ischemiát követő 15. percben,

melyek IPC alkalmazásával kivédhetők. Patkányokon végzett kísérletekben hasonló korai MPO enzimaktivitás emelkedést tapasztaltak, mely a reperfúzió 6. órájában is jelen volt. E késői reperfúziós reakció nNOS-dependenciáját nNOS gátlószer alkalmazásával és knockout állatokon végzett kísérletekkel is bizonyították. Cremaster lebény modellben a 7-NI nem befolyásolta az IPC hatását a PMN leukocytá-endothelsejt interakcióra (4h/2h IR). Jelen vizsgálatunkban elsőként mutattuk ki az nNOS szerepét a vékonybél IPC védőmechanizmusában az MPO enzimaktivitás csökkenésével.

A vékonybél IPC-nek ez a pozitív hatása a hízósejt-dependens mediátorok felszabadulásával is összefüggésben állhat. Kísérleteinkben az IR által indukált hízósejt degranuláció mértékét az IPC jelentősen csökkentette a reperfúzió során. A 7-NI előkezelés ezt a kedvező IPC hatást meggátolta. Ezért feltételezhetjük, hogy a jelen IPC modellben az nNOS csökkenti a hízósejt degranuláció mértékét, ezáltal a vékonybél mucosa strukturális károsodását kedvezően befolyásolja.

Az oxidatív károsodáson kívül az enterocyták integritása nagymértékben függ az adekvát oxigénszállítástól is. Tanulmányunk bizonyítottan viszonylag csekély IR-indukált makrohemodinamikai változásokat mutatott ki, ugyanakkor markáns és tartós romlás alakult ki mikrokeringésben. Kísérleteink alapján bizonyítottan tekinthetjük az IPC pozitív hatását az IR által indukált károsodásokra a vékonybél mikrokeringésben, a szöveti oxigenizációban és a leukocytá-endothelsejt interakcióban a vékonybél mikro-érrendszerén belül. Ezeket a reakciókat az IPC által kiváltott csökkent intestinalis oxidatív stresszel magyarázzák. Jelen vizsgálatunkban elsőként mutattuk ki, hogy a vékonybél IPC-t követő mikrokeringés gyors helyreállításában az nNOS-nak fontos szerepe van. Az MPO enzimaktivitás emelkedésnek és a morfológiai károsodásnak rendkívül korai megjelenését észleltük a reperfúziós fázisban, azonban a megtartott morfológiai integritás mellett a leukocytá-mediált reakciók jelentőségét nem zárhatjuk ki.

A második tanulmány következtetései

Jelenlegi vizsgálatunkban a vékonybél IPC számos előnyös hatását mutattuk ki például a pHi, a motilitás diszfunkció, a NOS aktivitás, a leukocytá akkumuláció, a hízósejt degranuláció és a mucosa károsodás vonatkozásában. A vizsgált paraméterek egy részét - különösen az IPC által indukált markáns NO képződést (NO_x és cNOS enzimaktivitás vonatkozásában), a pHi-t, a gyulladáshoz és morfológiai változásokat - az nNOS inhibitor 7-NI előkezelés befolyásolta illetve visszafordította. Ennél fogva adataink alátámasztják, hogy vékonybélben szoros összefüggés van az intestinalis nNOS enzim aktivitás és az IPC védőhatása között, az IR-okozta akut gyulladáshoz való válaszreakciók és morfológiai károsodások csökkentése révén.

6. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Kísérletes tanulmányunkban IVM alkalmazásával elsőként mutattuk ki az IPC jótékony postischemiás mikrokeringési hatásait hideg vékonybél ischemiát követő reperfúzió során, az SBTX egy nagyállat modelljében.
2. Hasonló mértékű mikrokeringési károsodást, korai PMN leukocita akkumulációt, hízósejt degranulációt és mucosa károsodást találtunk az IR és az SBTX modellekben. Ezek a változások IPC alkalmazásával jelentősen csökkenthetők voltak. Az SBTX-t követő korai reperfúziós véráramlás-változások a hideg ischemia és a denerváció következményei lehetnek.
3. Az intestinalis IR előtt alkalmazott IPC Ca^{2+} -dependens NOS enzimaktivitás fokozódást és akut NO felszabadulást vált ki a reperfúzió korai szakaszában.
4. Az IPC mérsékli az IR-okozta átmeneti vékonybél motilitás-növekedést a reperfúzió korai szakaszában. Az IPC kivédi az IR-okozta akut gyulladásos válaszreakciót és a vékonybél strukturális károsodását vélhetően a mikrokeringés/szöveti oxigenizáció, a PMN leukocita akkumuláció és a hízósejt degranuláció kedvező befolyásolása révén.
5. A vékonybél IPC védő hatásaiban az nNOS által termelt NO-nak alapvető szerepe lehet.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Boros Mihálynak, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy kutatást folytassak a Szegedi Tudományegyetem Sebészeti Műtéttani Intézetében és hogy hozzájárult a publikációim elkészítéséhez. Hasonlóképpen köszönettel tartozom Dr. Szabó Andreának és Dr. Kaszaki Józsefnek a kísérletek tervezéséért, a kísérleti tanulmányok során végzett útmutatásáért és segítségéért és a publikációim valamint az értekezésem megírásában való közreműködéséért. Ezen kívül szeretnék köszönetet mondani Dr. Bogáts Gábornak és Prof. Dr. Forster Tamásnak, hogy kutatásomban támogattak, továbbá köszönettel tartozom a Sebészeti Műtéttani Intézet és a II. sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ Szívsebészeti Osztályának minden munkatársának, hogy biztosították a kísérletekhez és az értekezéshez szükséges feltételeket. Végül nagyon hálás vagyok a feleségemnek és a családomnak a szeretetükért és támogatásukért és hogy bátorítottak céljaim elérésében.

Kutatási támogatások: NKFIH K116689, K120232, GINOP-2.3.2-15-2016-00034, EFOP-3.6.2-16-2017-00006.

**AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ TELJES TERJEDELMŰ
KÖZLEMÉNYEK:**

- I. Wolfárd A, Kaszaki J, **Varga S**, Lázár G, Boros M. Early microcirculatory changes after ischemic preconditioning and small bowel autotransplantation. *Eur Surg Res.* 2007;39:284-290. **IF: 0,92**
- II. **Varga S**, Juhász L, Gál P, Bogáts G, Boros M, Palásthy Z, Szabó A, Kaszaki J. Neuronal nitric oxide mediates the anti-inflammatory effects of intestinal ischemic preconditioning. *J Surg Res.* 2019;244:241-250. **IF: 1,872**

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ TELJES ELŐADÁSKIVONAT:

- I. **Varga S**, Krishnan V, Balázs L, Gál P, Kaszaki J, Boros M. The role of neuronal nitric oxide in the mechanism of intestinal preconditioning. *Eur Surg Res.* 2002;34(S1): 2-3.
- II. Wolfárd A, Kaszaki J, Szalay L, **Varga S**, Balogh Á, Boros M. Effects of ischemic preconditioning on the graft microcirculation during small bowel transplantation. *Eur Surg Res.* 2002;34(S1):17.
- III. Wolfárd A, Kaszaki J, Szalay L, **Varga S**, Balogh Á, Boros M. Ischemic preconditioning improves graft microcirculation during small bowel transplantation. *Acta Physiol Hung.* 2002;89:65.
- IV. Kaszaki J, **Varga S**, Gál P, Nagy S, Boros M. Neuronal nitric oxide protects the mucosa following intestinal preconditioning. *Acta Physiol Hung.* 2002;89:119.
- V. Wolfárd A, Kaszaki J, Szalay L, **Varga S**, Balogh Á, Boros M. Ischemic preconditioning improves macrohemodynamics and graft microcirculation after small bowel transplantation. *Shock.* 2002;18S:74.
- VI. **Varga S**, Kaszaki J, Balázs L, Gál P, Lőrincz A, Nagy S, Boros M. Protective role of neuronal nitric oxide following intestinal preconditioning. *Shock.* 2002;18S:27.
- VII. **Varga S**, Kaszaki J, Balázs L, Gál P, Bogáts G, Boros M. A neuronális eredetű nitrogénmonoxid szerepe az ischaemiás prekondicionálásban. *Magy Seb.* 2003;56:158.
- VIII. Wolfárd A, Kaszaki J, **Varga S**, Balogh Á, Boros M. A vékonybél mikrokeringésének változásai ischaemiás prekondicionálás hatására vékonybél autotranszplantációt követően – a hízósejtek szerepe. *Magy Seb.* 2003;56:159.